

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





17W

PATENT  
1379-1-022

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT(S): José Manuel ANDREU MORALES EXAMINER : unassigned  
SERIAL NO. : 10/761,150 ART UNIT : 1645  
FILED : January 20, 2004  
FOR : METHOD OF DETECTING AND ANALYZING PACLITAXEL-  
MIMETIC COMPOUNDS

Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to COMMISSIONER FOR PATENTS, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on June 21, 2004.

PETITION FOR GRANT OF PRIORITY UNDER 35 USC 119

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby petitions for grant of priority of the present Application on the basis of the following prior filed foreign Application:

<u>COUNTRY</u>	<u>SERIAL NO.</u>	<u>FILING DATE</u>
SPAIN	200101710	JULY 20, 2001

To perfect Applicant's claim to priority, a certified copy of the above listed prior filed Application is enclosed.

Acknowledgment of Applicant's perfection of claim to priority is accordingly requested.

Respectfully submitted,

David A. Jackson  
Attorney for Applicant  
Registration No. 26,742

KLAUBER & JACKSON  
411 Hackensack Avenue  
Hackensack, NJ 07601  
201)487-5800



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100





MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



## CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200101710, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 20 de Julio de 2001.

Madrid, 10 de Mayo de 2004

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica.

P.D.

CARMEN LENCE REIJA





MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

# INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200101710

01 JUL 20 12:11

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

28

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICION A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL  
CONSEJO SUPERIOR INVESTIG. CIENTÍFICAS

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS

ES

DNI/CIF

Q28/18002D

CNAE

PYME

5

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Dpto. SECRETARÍA GENERAL  
REPROGRAFÍA  
Panamá, 1 - Madrid

TELÉFONO 91 585 50 00

FAX 91 585 52 87

CORREO ELECTRÓNICO

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO

ANDREU MORALES

DÍAZ PEREIRA

BARASOAIN BLASCO

JOSÉ MANUEL

JOSÉ FERNANDO

MARÍA ISABEL

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

PAÍS

ES

ES

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENCIÓN LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO

PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☒

(15) AGENTE / REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENARSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

PEDRO OJEDA GARCÍA, CALLE SERRANO, 113 - 28006 MADRID

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 18

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 2

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: 2

☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: AUTORIZACIÓN

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMA, 1 • 28071 MADRID



(12)

## SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD  
P 200101710

(31) NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAÍS

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN

(62) PATENTE DE LA QUE ES  
DIVISORIA

(71) SOLICITANTE (S)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

DOMICILIO SERRANO, 117 - 28006 MADRID

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

(72) INVENTOR (ES) JOSÉ MANUEL ANDREU MORALES, JOSÉ FERNANDO DÍAZ PEREIRA Y MARÍA ISABEL BARASOAIN BLASCO

(51) Int. Cl. 7

G 01 N 33/50

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(54) TÍTULO DE LA INVENCION

METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS  
MIMETICOS DE PACLITAXEL

(57) RESUMEN

### METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL.

Una gran parte de los citostáticos, entre ellos paclitaxel (Taxol ®) y otras sustancias recientemente descubiertas que mimetizan sus efectos antitumorales, tienen como diana los microtúbulos celulares. La presente invención es un ensayo homogéneo de alto rendimiento, basado en la utilización de microtúbulos estabilizados y taxoides fluorescentes, para detectar cualesquiera sustancias que puedan sustituir al paclitaxel en su sitio de unión en los microtúbulos, y constituir potencialmente agentes anticancerosos.



**TITULO:****METODO DE DETECCION Y EVALUACION DE COMPUESTOS MIMETICOS DE PACLITAXEL.****SECTOR DE LA TECNICA:**

- 5 Sector farmacéutico. Agentes antitumorales. Ensayo homogéneo de alto rendimiento para la detección de sustancias que puedan sustituir a paclitaxel en su sitio de unión en los microtúbulos y por tanto con actividad potencial como agentes antitumorales.

**ESTADO DE LA TECNICA:**

- 10 El paclitaxel (Taxol ®), un compuesto muy empleado en la quimioterapia del cáncer, presenta como otros agentes anticancerosos, efectos secundarios. Este compuesto diterpenoide se extrajo originalmente de la corteza de una planta, *Taxus brevifolia*, de crecimiento lento, lo que conllevaba un problema de falta de una fuente barata y disponible de paclitaxel. El paclitaxel utilizado
- 15 actualmente es un producto de semisíntesis a partir de un precursor extraído de la hoja del tejo. Además, el paclitaxel presenta problemas de extrema insolubilidad. Por lo tanto, aunque el paclitaxel es un agente quimioterapéutico con una muy importante actividad biológica, el descubrimiento de nuevas fuentes de paclitaxel o bien de compuestos miméticos de paclitaxel tiene una
- 20 decisiva utilidad.
- El paclitaxel promueve el ensamblaje de  $\alpha\beta$ -tubulina en microtubulos por unión preferencial a tubulina ensamblada más que a la tubulina no ensamblada. Su efecto está relacionado con el del nucleótido GTP, con importantes diferencias. El GTP se une a un extremo del dímero de tubulina haciendo contacto con el
- 25 siguiente dímero a lo largo de cada protofilamento que forma el microtúbulo, mientras el paclitaxel se une a un lado de  $\beta$ -tubulina cerca del contacto con el siguiente protofilamento; en la  $\alpha$ -tubulina, la zona correspondiente a la cavidad de unión a paclitaxel está ocupada por un bucle de la cadena peptídica (Nogales, E.). Los dímeros de tubulina sin ensamblar unen GTP y el sitio de
- 30 unión queda ocluido por el ensamblaje, mientras el sitio de unión a paclitaxel existe sólo en tubulina ensamblada. La hidrólisis de GTP permite el

desensamblaje y la regulación del sistema de microtúbulos, sin embargo, la activación de la tubulina por paclitaxel es permanente, estabilizando los microtúbulos.

- La supresión de la dinámica de microtúbulos celular por paclitaxel es una causa principal de la inhibición de la división celular y de la muerte de las células tumorales (Jordan, M.A. y Wilson, L.). Un número de sustancias naturales diversas, incluyendo epotilonas (Bollag, D.M. et al), discodermolida (Ter Haar, E. et al), eleuterobina (Long, B.H. et al), y laulimalida (Mooberry, S.I. et al) imitan los efectos citotóxicos de paclitaxel, aparentemente uniéndose a su sitio en los microtúbulos. Cada una de estas sustancias fue descubierta con diferentes ensayos para actividades similares a la de paclitaxel.
- Algunas patentes describen métodos para identificar compuestos con actividades semejantes a paclitaxel. En la patente americana US 5340724 (Upjohn Co.) se describe un método empleando células (Tax 2-4 CHO) dependientes de paclitaxel y detectando su crecimiento. La solicitud PCT WO9420134 (Universidad de Columbia) proporciona dos anticuerpos monoclonales producidos por dos hibridomas que son capaces de unirse a paclitaxel y a sus análogos, así como su utilización para determinar la presencia y cantidad de paclitaxel o sus derivados biológicamente activos. Otra solicitud PCT WO0056894 (Cytoclonal pharmaceuticals, Inc.), describe las secuencias de ADN que codifican la beta tubulina de distintas especies de hongos del género Pestalotiopsis, estos segmentos de ADN purificados se emplean para detectar compuestos con actividad antitumoral. Otra solicitud PCT WO 9953295 (Universidad de California), consiste en un método para la detección de agentes que modulan la despolimerización de los microtúbulos, poniendo en contacto microtúbulos polimerizados, una proteína que los despolimeriza y las sustancias a ensayar en presencia de ATP o GTP y detectando la formación de monómeros, dímeros u oligómeros de tubulina mediante diferentes métodos como cambio de fluorescencia (DAPI), centrifugación, etc.
- Sin embargo, en contraste con otras dianas biológicas importantes, hasta ahora se carecía de un ensayo estándar para detectar y medir directamente otros

ligandos cualesquiera capaces de reemplazar a paclitaxel en su sitio de unión en los microtúbulos.

Los métodos basados en la luminiscencia son muy útiles para estos propósitos. Los derivados fluorescentes, hidrosolubles y activos, de paclitaxel unidos con un intermediario de alanina en la posición no esencial 7 (Souto, A.A. et al) son sondas específicas del sitio de unión de paclitaxel a los microtúbulos (Evangelio, J.A., et al). Estos taxoides fluorescentes se han usado principalmente para localizar sitios subcelulares de unión de taxoide citotóxico a microtúbulos del polo del huso y a centrosomas (Abal, M.A., et al), así como para medir la cinética rápida de unión y de disociación del sitio de paclitaxel, que está expuesto en microtúbulos (Díaz, J.F., et al).

El objeto primordial de esta invención es el desarrollo un ensayo fluorescente homogéneo de unión de ligando al sitio de paclitaxel en los microtúbulos, que permite la detección de alto rendimiento de nuevos miméticos de paclitaxel. El método se basa en la combinación de dos componentes, una diana y una sonda. La diana está constituida por microtúbulos ensamblados in vitro los cuales se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan en nitrógeno líquido. Este método de conservación es novedoso. Como sonda se emplean derivados fluorescentes de paclitaxel, que se unen específicamente a los microtúbulos (patentes ES 2121549, ES 2105983, WO9719938, Consejo Superior de Investigaciones Científicas) (Díaz, J.F., et al).

Las aplicaciones de este método son: búsqueda de nuevos agentes antitumorales a partir de bibliotecas de extractos y compuestos naturales y sintéticos; evaluación de modificaciones químicas de series de compuestos existentes (incluyendo paclitaxel, epotilona, discodermolida, euterobina, laulimalida); valoración de contenido en taxanos activos en fuentes naturales; investigación biológica y oncológica.

## DESCRIPCION DE LA INVENCION

### Descripción breve de la invención

El sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos también une otros ligandos recientemente descubiertos con actividad antitumoral. En la presente invención se ha diseñado un ensayo homogéneo de alto rendimiento para la detección de biomiméticos de paclitaxel, basado en el desplazamiento del taxoide fluorescente 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel de su sitio de unión en soluciones diluidas de microtúbulos conservados.

El método de detección, objeto de la presente invención y que se reivindica, se basa en la combinación de los dos componentes, la diana, que consiste en los microtúbulos ensamblados in vitro que se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan indefinidamente congelados en nitrógeno líquido hasta su utilización, este método de conservar los microtúbulos también se reivindica en la presente invención, y la sonda, que consiste en dicho derivado fluoresceinado de paclitaxel que se une específicamente a los microtúbulos.

El método consiste en la adición de las sustancias a ensayar (no fluorescentes) a múltiples alícuotas de una solución diluida de la diana y la sonda en microplacas multipocillo. Las sustancias a ensayar pueden ser los compuestos de las familias de discodermolida, eleuterobina, sarcodicitina, epotilonas y paclitaxel. Este método también tiene aplicación para medir contenidos activos de tipo paclitaxel de fuentes naturales y para la detección de alto rendimiento de nuevos biomiméticos de paclitaxel.

La sonda unida a la diana posee un valor de anisotropía de fluorescencia mucho mayor que el de la sonda libre; el desplazamiento por cualesquiera sustancias competidoras de la interacción de la sonda (ligando de referencia) con la diana se detecta midiendo el descenso de anisotropía de la fluorescencia de la sonda con un lector de polarización de fluorescencia en microplacas. Alternativamente se utiliza el descenso de transferencia resonante de energía (RET) de la sonda unida a un ligando aceptor rodaminado, 7-O-[N-(4'-tetrametilrodamina-carbonil)-L-alanil-] Paclitaxel o el cambio de intensidad de fluorescencia de la sonda 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil-]

Paclitaxel. Este método tiene aplicación en el desarrollo de herramientas para la realización de ensayos en investigación oncológica y/o biológica.

También es objeto de la presente invención el método para conservar los microtúbulos indefinidamente. Este método consiste en dializar los  
5 microtúbulos entrecruzados contra un tampón de conservación y criopreservarlos.

### Descripción detallada de la invención

Con el fin de establecer un ensayo eficaz de competición basado en  
10 fluorescencia para la unión de ligando al sitio de paclitaxel en los microtúbulos, se investigaron los cambios de las propiedades fluorescentes de la sonda 7-0-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel (Flutax-2;10) sobre la unión específica a microtúbulos. El Flutax-2 se prefirió al análogo Flutax-1 con fluoresceína no fluorada por su superior fotoestabilidad y pK ácido (dando el di-  
15 anión fuertemente fluorescente a valores de pH neutros). Se investigaron métodos de anisotropía de fluorescencia y de transferencia de energía de resonancia (RET), y medidas de intensidad de la emisión (con Flutax-1). Puesto que los microtúbulos se unen a Paclitaxel y a Flutax con gran afinidad, se necesitan bajas concentraciones de sitios de unión con el fin de detectar los  
20 competidores de afinidad inferior. Estos sitios de unión estabilizados por dilución fueron proporcionados por microtúbulos entrecruzados suavemente (ver Ejemplo; Evangelio, J.A. et al.; Diaz, J.F. et al.).

Validación de la sonda y diana. A) Medida de la unión específica de Flutax-2 a microtúbulos mediante anisotropía de fluorescencia y su cancelación por  
25 paclitaxel

La intensidad de fluorescencia de Flutax-2 cambia muy poco con la unión a microtúbulos. Hay un pequeño cambio en el máximo de excitación de 494nm a 495nm (punto isobéstico a 500nm) y un desplazamiento azul de emisión de 523nm a 520nm (no mostrado aquí, punto isobéstico a 525nm; Diaz, J.F. et  
30 al.). Sin embargo, la polarización de fluorescencia de Flutax-2 aumenta significativamente por la unión. Se compararon el espectro de anisotropía de excitación de una solución de sitios de microtúbulo-Flutax-2 50nM con el

espectro de una solución similar en la que los sitios de unión fueron bloqueados con un exceso de paclitaxel y con el del Flutax-2 libre. Tanto la anisotropía negativa de la banda 329nm como la anisotropía positiva de la transición de excitación de energía inferior (495nm) de la difluoro-fluoresceína son específicamente aumentados por unión de Flutax-2 a microtúbulos. Los valores de anisotropía determinados para la banda 495nm (emisión 520nm; tampón GAB que contiene glicerol, 25°C) fueron: Flutax-2 libre (50nm),  $r_{\min} = 0,055$ ; en presencia de microtúbulos bloqueados con paclitaxel,  $r = 0,060$ ; Flutax-2 específicamente unido a los microtúbulos,  $r_{\max} = 0,29$  (el último se determinó por valoración de Flutax-2 50nm con concentraciones crecientes de microtúbulos). Estos cambios son consistentes con una fuerte inmovilización del fluoróforo por la unión. Además del anclaje de Flutax-2 a través de su resto paclitaxel, se ha propuesto una interacción del di-anion fluoresceína con un residuo catiónico de microtúbulos, posiblemente Arg 282 de  $\beta$ -tubulina (Evangelio, J.A. et al.; ver Fig. 10 en Díaz, J.F. et al.).

Una isoterma de unión de Flutax-2 a microtúbulos, determinada a partir del cambio de anisotropía del ligando, indica una constante de equilibrio de la unión con valor  $K_b = 11,5 \pm 0,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  en tampón GAB-GDP a 25°C (no es significativamente diferente de los valores previamente determinados por centrifugación (Díaz, J.F. et al.). La unión de Flutax-2 a estas concentraciones es completamente anulada por paclitaxel 10 $\mu$ M.

Basándose en estos resultados, en la observación de la capacidad de Flutax-2 de sustituir a  $^3\text{H}$ -Paclitaxel de su sitio de unión, y en los resultados previos discutidos en un estudio cinético detallado (Díaz, J.F. et al.), Flutax-2 puede considerarse una sonda genuina del sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos.

Validación de la sonda y diana. B) Detección de la unión de Flutax-2 a microtúbulos mediante transferencia de energía (RET) a otro taxoide fluorescente y su cancelación por paclitaxel.

Las distancias de mayor proximidad entre sitios de unión a paclitaxel en subunidades de  $\beta$ -tubulina de microtúbulos son ca. 5,5, 8 y 9,5nm (Nogales, E., et al.), un intervalo de distancia apropiado para RET desde fluoresceína a fluoróforos de rodamina. El desplazamiento del donador o aceptor de sus sitios

de unión por otro ligando no fluorescente suprimiría la emisión del aceptor por excitación del donador. El espectro de emisión (excitación a 460nm) de sitios de unión de microtúbulos 50nM con Flutax-2 10nM y Rotax 40nM (7-O-[N-(4'-tetrametilrodamina-carbonil)-L-alanil-] Paclitaxel (Evangelio, J.A. et al) mostró un pico de emisión sensibilizada de Rotax, además de la emisión de Flutax-2. Cuando los sitios de unión se bloquearon con paclitaxel la emisión de fluoresceína aumentó (no se apagó) y cambió de 521 a 524 nm, mientras la contribución de rodamina decreció a un nivel (un hombro) que era similar al de la emisión no sensibilizada de Rotax a 582nm. Este experimento indicó la posibilidad de detectar una unión de ligando al sitio de paclitaxel por el decrecimiento de RET.

Validación de la sonda y diana. C) Detección de la unión de Flutax-1 a microtúbulos mediante transferencia de energía (RET) a otro taxoide fluorescente y su cancelación por paclitaxel.

Utilizando Flutax-1 es posible caracterizar el desplazamiento por variación de la intensidad de fluorescencia.

Ensayo fluorescente de detección y evaluación de ligandos que interaccionan con el sitio de unión de paclitaxel en los microtúbulos.

Usando Flutax-2 como una sonda de referencia del sitio de unión a paclitaxel, la unión de otros ligandos no fluorescentes que desplazan Flutax-2 de los microtúbulos (ver Figura 1) puede medirse fácilmente por los cambios en sus propias propiedades de fluorescencia en un ensayo de competición. Se ha empleado el cambio en la anisotropía de fluorescencia, que fue analizado en placas de 96 pocillos con un lector de microplaca. La Figura 2 muestra cómo el paclitaxel y el docetaxel disminuyen eficazmente la anisotropía de fluorescencia de soluciones de Flutax-2 50nM- sitios de microtúbulos 50nM. El análisis numérico de las isotermas de desplazamiento (ver Ejemplo) indicó que paclitaxel y docetaxel se unen a microtúbulos con constantes de unión de equilibrio de  $(3,7 \pm 1,5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  (4 determinaciones) y  $(6,0 \pm 2,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  (2 determinaciones) respectivamente a 25°C. La relación de afinidades de docetaxel a paclitaxel fue  $2,7 \pm 0,2$  a partir de los experimentos individuales. Una afinidad 2 veces mayor de docetaxel comparado con paclitaxel está de

acuerdo con una determinación directa previa (Díaz, J.F. y Andreu, J.M.). La  
 afinidad de paclitaxel es del mismo orden de magnitud que los valores  
 previamente determinados para paclitaxel (Parness, J. y Horwitz, S.B.), 2-  
 debenzoil-2-(m-aminobenzoil) paclitaxel (Han. Y., et al.) y 3'-N-m-  
 aminobenzamido-3'-N-debenzamido-Paclitaxel (Li, Y. et al.). La baccatina III,  
 generalmente considerada hasta ahora como un compuesto inactivo, inhibió  
 completamente la anisotropía de microtúbulo Flutax-2, aunque a  
 concentraciones totales aproximadamente 200 veces más grandes que  
 paclitaxel (ver Fig. 1). El análisis de los datos de desplazamiento indicó que  
 baccatina III es reconocida por el sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos con  
 una constante de equilibrio de  $(1,5 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (7 determinaciones).  
 Baccatina III es equivalente al sistema de anillo taxano, en el que el grupo C-13  
 OH sustituye a la cadena lateral de paclitaxel (ver estructuras químicas en la  
 Fig. 2). La cadena lateral C-13 ha sido considerada previamente como un  
 determinante esencial para el reconocimiento de paclitaxel. Sin embargo, el  
 éster metílico de la cadena lateral C-13 fue, dentro de su límite de solubilidad,  
 inactivo para desplazar a Flutax-2. Los resultados indicaron una constante de  
 equilibrio de unión inferior a  $10^3 \text{ M}^{-1}$  para este análogo de la cadena lateral C-  
 13 separado del resto de la molécula (ver Fig. 2; 2 determinaciones).  
 En una serie de medidas de control, el desplazamiento de la interacción de  $^3\text{H}$ -  
 paclitaxel con microtúbulos por baccatina III y Flutax-2 se evidenció por  
 sedimentación y conteo de centelleo. Los resultados de estas mediciones (ver  
 Ejemplo) fueron compatibles con los de los ensayos de anisotropía de  
 fluorescencia, excepto para una afinidad aparente 7-veces inferior de Flutax-2.  
 Esto confirmó que baccatina III se reconoce por el sitio de unión a paclitaxel de  
 microtúbulos. Sin embargo, con el fin de tener la mayoría del trazador  
 radiactivo  $^3\text{H}$ -paclitaxel en solución, en vez de adsorberse al tubo de  
 policarbonato de la ultracentrífuga de mesa, fue necesario incluir  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  de  
 seroalbúmina bovina, que une paclitaxel (manteniéndolo disponible para la  
 interacción con microtúbulos) así como Flutax-2 (disminuyendo su afinidad  
 aparente). Estos procesos de adsorción imposibilitan una medida rigurosa  
 directa de la afinidad de la unión a paclitaxel a microtúbulos en nuestras



manos, y por tanto de la afinidad de sus competidores usando paclitaxel como un ligando de referencia en estos ensayos diluïdos. Las desventajas adicionales de los ensayos de uni3n de <sup>3</sup>H-paclitaxel en comparaci3n con el ensayo homog3neo de anisotropía de taxoide fluorescente, son las operaciones de centrifugaci3n, separaci3n y medici3n radioactiva, requeridas.

Utilizaci3n del ensayo de anisotropía de fluorescencia en microplaca en comparaci3n con otros m3todos para detectar mim3ticos de paclitaxel.

El m3todo fluorescente de detecci3n de uni3n de ligandos al sitio paclitaxel de microt3bulos desarrollado en este trabajo constituye un primer ensayo homog3neo para cualquier otra sustancia que actúe sobre este importante blanco antitumoral. Su simplicidad se compara favorablemente con m3todos de cribaje (screening) basados en la estabilizaci3n de microt3bulos (Bollag, D.M., et al.; [www.cytoskeleton.com](http://www.cytoskeleton.com)) y con los ensayos competitivos que utilizan Paclitaxel marcado radiactivamente (m3s arriba, Bollag, D.M. et al.; DÍaz, J.F. y Andreu, J.M.). Los anticuerpos monoclonales específcos de taxano ofrecen sensibilidad posiblemente insuperable para la determinaci3n de contenidos de fármacos y compuestos estrechamente relacionados (Grothaus, P.G., et al.; O'Boyle, K.P.; Bicamumpaka, C. y Page, M.), sin embargo, pueden fallar en reconocer ligandos no relacionados químicamente del sitio de uni3n a paclitaxel del microt3bulo. Puesto que se pueden analizar fáclmente múltiples muestras con el m3todo de polarizaci3n por fluorescencia, este ensayo constituye una herramienta útil para la evaluaci3n de la afinidad de uni3n de compuestos recientemente diseñados de las familias de discodermolida, eleuterobina, epotilonas y paclitaxel. También es aplicable a la medici3n de contenidos activos tipo paclitaxel de fuentes naturales, y para la investigaci3n de alto rendimiento de nuevos biomim3ticos de paclitaxel, en un modo complementario de las exploraciones celulares para inhibidores mit3ticos, como los utilizados en el descubrimiento de monastrol (Mayer, T.U., et al.). Una propiedad interesante del ensayo de anisotropía de fluorescencia es su sensibilidad para la detecci3n de ligandos de afinidad media. Ello es posible por la combinaci3n de un taxoide áltamente fluorescente (Flutax-2) con microt3bulos estabilizados, permitiendo la gran diluci3n necesaria para el desplazamiento efectivo de la sonda por

ligantes más débiles, que de otra forma no se detectarían. Un ejemplo es la detección de la unión de baccatina III, que proporciona una nueva visión del reconocimiento molecular de paclitaxel por microtúbulos.

## 5 BIBLIOGRAFIA

- Abal, M.A., Souto, A.A., Amat-Guerri, F., Acuña, A.U., Andreu, J.M. y Barasoain, (2001) *Cell Motil. Cytosk.* 49, 1-15
- Andreu, J.M., Perez-Ramirez, B., Gorbunoff, M.J., Ayala, D. y Timasheff, S.N. (1998) *Biochemistry* 37, 8356-8368.
- 10 Bicomumpaka, C. y Page, M. (1998) *J. Immunol. Meth.* 212, 1-7.
- Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Henses, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Diaz, J.F. y Andreu, J.M. (1993) *Biochemistry* 32, 2747-2755.
- Díaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A. y Andreu, J.M. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 26265-26276
- 15 Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuña, A.U., Amat- Guerri, F., y Andreu, J.M. (1998) *Cell Motil. Cytoskel.* 39, 73-90.
- Grothaus, P.G., Bignami, G.S., O'Malley, S., Harada, K.E., Byrnes, J.B., Waller, D.F., Raybould, T.J., McGuire, M.T. y Alvarado, B. (1995) *J. Nat. Prod.* 58, 1003-1014.
- 20 Han, Y., Chaudhary, A.G., Chordia, M.D., Sackett, D.L., Perez-Ramirez, B., Kingston, D.G. y Bane S. (1996) *Biochemistry* 35, 14173-14183
- Jimenez-Barbero, J., Souto, A.A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., y Amat-Guerri, F. (1998) *Bioorg. Med. Chem.* 6, 1857-1863.
- 25 Jordan, M.A. y Wilson, L. (1998) *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 123-130
- Lackowicz J.R. (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer/ Plenum, New York, N.Y.
- Li, Y., Edsall, R. Jr., Jagtap, P.G., Kingston, D.G.I., y Bane, S. (2000) *Biochemistry* 39, 616-623
- 30 Long, B.H., Carboni, J.M., Wasserman, A.J., Cornell, L.A., Casazza, A.M., Jensen, P.R., Lindel, T., Fenical, W. y Fairchild, CR. (1998) *Cancer Res.* 58, 1111-1115.

- Mayer, T.U., Kapoor, T.M., Haggarty, S.J., King, R.W., Schreiber, S.L. y Mitchison, T.J. (1999) *Science* 286, 971-974
- Medrano, F.J., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J. y Timasheff, S.N. (1991) *Biochemistry* 30, 3770-3777.
- 5 Mooberry, S.I., Tien, G., Hernandez, A.H., Plubrukarn, A. y Davidson, B.S. (1999) *Cancer Res.* 59, 653-660
- Nogales, E. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* 69, 277-302
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A. y Downing, K.H. (1999) *Cell* 96, 79-88.
- 10 Nogales, E., Wolf, S.G. y Downing, K. (1998) *Nature* 391, 199-203.
- O'Boyle, K.P., Wang, Y., Schwarz, E.L., Regl, D.L., Einzig, A., Dutcher, J.P., Wiernik, P.H. y Horwitz, S.B. (1997) *Cancer* 79, 1022-1030
- Parness, J. and Horwitz, S.B. (1981) *J. Cell. Biol.* 91, 479-487.
- Souto, A.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., Barasoain, I., Abal, M., y Amat-Guerri, F. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 2710-2712.
- 15 Ter Haar, E., Kowalsky, R.J., Lin, C.M., Longley, R.E., Gunasekera, S.P., Rosenkranz, H.S., y Day, B.W. (1996) *Biochemistry* 35, 243-250.

### DESCRIPCION DETALLADA DE LAS FIGURAS

- 20 **FIGURA 1.** Una micrografía de fluorescencia de una mezcla de reacción típica utilizada en esta invención, que consiste en microtúbulos estabilizados (sitios de taxoide 100nM) y Flutax-2 taxoide fluorescente (100nM). La barra indica 10µm.
- 25 **FIGURA 2.** Isotermas de competición de ligandos que se unen al sitio de paclitaxel de microtúbulos en tampón GAB-GDP a 25°C. La anisotropía de fluorescencia de soluciones múltiples de Flutax-2 50nM y sitios de unión de microtúbulos 50nM con diversas concentraciones de competidores se midió por duplicado, utilizando un lector de microplaca. Los círculos sólidos, paclitaxel
- 30 (1); los círculos vacíos, docetaxel; los cuadrados, baccatina III (2), los triángulos, éster metílico de la cadena lateral C-13 de paclitaxel (3); las cruces, controles correspondientes con DMSO 1% (v/v) sin ligando. En este ensayo,

cada curva de competición comienza con un valor de anisotropía correspondiente a dos tercios de moléculas de Flutax-2 unidas, que se reducen progresivamente por el competidor que sustituye a Flutax-2 en los sitios de unión. La constante de equilibrio de unión de Flutax-2 es  $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Las

5 líneas 1 (discontinua corta) y 2 (continua) corresponden a los mejores ajustes para la unión de paclitaxel y baccatina al mismo sitio con valores de constante de equilibrio de  $K = 3,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  y  $K = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  respectivamente; la línea

10 larga discontinua es el ajuste a los datos de docetaxel,  $K = 8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ; la línea de puntos que pasa a través de los datos del éster metílico de cadena lateral es una simulación de una unión de afinidad baja con  $K = 7 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  (obsérvese que estos últimos datos son similares a los de los controles).

## EJEMPLO DE REALIZACION DE LA INVENCION

### 1. Taxoides. Sonda fluorescente.

15 Se prepararon soluciones de serie concentradas y se mantuvieron a  $-20^\circ\text{C}$  en ambiente seco. El paclitaxel (del National Cancer Institute, Bethesda, MD) se midió espectrofotométricamente a 273nm después de dilución en metanol, usando un coeficiente de extinción de  $1.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Diaz, J.F. y Andreu, J.M.).  $^3\text{H}$ -Paclitaxel ( $4 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ) se obtuvo de Moravsek Biochemicals (Brea,

20 CA). Docetaxel (Taxotere) fue proporcionado por Rhône-Poulenc Rorer (Antony, France). Baccatina III se obtuvo de Sigma; se encontró desprovisto de impurezas por HPLC (un gradiente 20-80% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético acuoso al 0,05%, en una columna C-18, monitorizado a 228nm). Un coeficiente de extinción de baccatina III determinado aproximadamente fue

25  $900 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (273nm, metanol). Baccatina III era soluble a las concentraciones utilizadas en fosfato sódico 10mM, etilenglicol bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetracético (EGTA) 1mM, GTP 0,1mM,  $\text{MgCl}_2$  6mM, glicerol 3,4 M, (tampón GAB) pH 6,5 con DMSO al 1%. El éster metílico de la

30 cadena lateral C-13 de paclitaxel fue proporcionado por E. Baloglu y D.G.I. Kingston del Virginia Polytechnic Institute (Blacksburg, VA). La absortividad molar de este compuesto es de alrededor de  $750 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 273nm (cola de absorción, metanol) y era soluble a 0,75mM en tampón GAB-DMSO 1%.

Obsérvese que las absorptividades 273nm añadidas de baccatina III y el éster metílico de la cadena lateral eran aproximadamente las de paclitaxel. F. Amat-Guerri, del Instituto de Química Orgánica, CSIC (Madrid, España) proporcionó la sonda fluorescente Flutax-2; se comprobó su pureza con HPLC y se determinó su concentración espectrofotométricamente con dodecil sulfato de sodio al 0,5% (SDS), a pH neutro, usando un coeficiente de extinción de 49,100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 496nm (Díaz, J.F., et al.).

## 2. Diana: microtúbulos entrecruzados.

Se purificó y almacenó tubulina de cerebro bovino, y se midió su concentración como se ha descrito (Andreu, J.M., et al.). Antes de su utilización se equilibró en fosfato sódico 10mM, EGTA 1mM, GTP 0,1mM, glicerol 3,5M pH 6,8, con una columna de gravedad de Sephadex G-25 en frío, y se centrifugó 10 min. a 50.000 en un rotor TLA 100,4 en frío (Beckman). La tubulina 50μM se hizo 6mM en MgCl<sub>2</sub> (es decir tampón de ensamblaje de glicerol GAB, pH final 6,5) y GTP 1mM, se ensambló en microtúbulos a 37°C y estos se entrecruzaron suavemente con glutaraldehído 20mM, deteniendo la reacción con NaBH<sub>4</sub> como se ha descrito (Díaz, J.F., et al.). Estos microtúbulos entrecruzados tienen la misma especificidad, cinética, y estequiometría de unión de Flutax-2; que los controles no entrecruzados; tienen una morfología normal bajo el microscopio electrónico (Díaz, J.F., et al.). Los microtúbulos entrecruzados se dializaron contra GAB-0,1 mM nucleótido (GTP o GDP) durante más de 16h en frío en cassetes de diálisis (Pierce) y se conservaron congelados gota a gota bajo nitrógeno líquido, o bien a 4°C con 0,05% de azida sódica. Este método de conservación de los microtúbulos entrecruzados, mediante diálisis contra un tampón de conservación y criopreservación se reivindica en la presente invención.

Su concentración de tubulina total se midió después de diluirlos en SDS al 1% utilizando un coeficiente de extinción de 107,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> a 275nm (Díaz, J.F. y Andreu, J.M.). La concentración de la tubulina unida se determinó por sedimentación y se encontró que era típicamente 80%-90% del total. La concentración de sitios de unión de taxoide se determinó por adición de concentraciones crecientes de microtúbulos entrecruzados a Flutax-2 5μM en

el tampón GAB-GDP, sedimentación (Díaz, J. F., et al.), 50.000 rpm en un rotor Beckman TLA 120 a 25°C) y medición espectrofotométrica de Flutax-2. Se observó que las preparaciones de microtúbulos entrecruzados unían 0,75 +/- 0,05 de Flutax-2 por tubulina total (es decir, como mínimo el 95% de la tubulina unida era activa uniendo este ligando). Las mediciones de control utilizando <sup>3</sup>H-paclitaxel y centelleo líquido dieron valores similares a Flutax-2. Una vez que se determinaron los valores de anisotropía de Flutax unido a microtúbulo y libre, el número de sitios pudo también determinarse por valoración de soluciones diluidas de microtúbulos entrecruzados con Flutax-2 (véase mas abajo). La concentración de sitios de unión de taxoides de las preparaciones de microtúbulos entrecruzados resultó estable bajo nitrógeno líquido, decayendo a velocidades comprendidas entre 0,02 y 0,05 día<sup>-1</sup> a 4°C (vidas medias de cinco y dos semanas respectivamente). Se utilizaron los microtúbulos entrecruzados dentro de una vida media a partir de la preparación. Una micrografía de fluorescencia de estos microtúbulos con Flutax-2 se muestra en la Fig.1.

### 3. Mediciones de espectroscopia de fluorescencia y anisotropía.

Se obtuvieron espectros de fluorescencia corregidos con un instrumento Fluorolog-3-221 de recuento de fotones (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia), con un ancho de banda de emisión de 5nm y excitación de 1µm, a 25°C. Las mediciones fluorométricas de concentración se realizaron con un espectrofluorómetro Shimadzu RF-540. Los espectros de anisotropía y las mediciones se recogieron en el modo formato-T de Fluorolog con excitación polarizada verticalmente y se corrigieron por la sensibilidad de cada canal con excitación polarizada horizontalmente (Lackowicz J.R.). Las mediciones múltiples de anisotropía, se realizaron con un lector de microplaca PolarStar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania) a 25°C. Las soluciones se excitaron con 200 pulsos de luz polarizada verticalmente (filtro de paso de banda 485-P, 480-492nm) y la emisión se analizó simultáneamente con filtros de polarización vertical y horizontal (paso de banda 520-P, 515-550nm). La sensibilidad de los dos canales se ajustó para dar el valor de anisotropía de Flutax-2 libre (0,055, polarización 0,080; tampón GAB a 25°C) en cavidades que contenían Flutax-2 y no microtúbulos. Los valores de blancos de pocillos

con microtúbulos y sin Flutax-2 se sustrajeron de los valores de intensidad de fluorescencia (los blancos representaron típicamente menos del 4% de la medición).

#### 4. Unión de Flutax a microtúbulos.

- 5 Se valoró primero Flutax-2 (50nM) con concentraciones crecientes de sitios de unión proporcionados por microtúbulos entrecruzados, en tampón GAB a 25C. La fracción de Flutax-2 unido es:

$$[F]_b / [F]_0 = (r - r_{\min}) / (r_{\max} - r_{\min}) \quad [1]$$

- 10 donde  $[F]_b$  y  $[F]_0$  son concentraciones totales y unidas de Flutax-2 respectivamente,  $r$  es anisotropía de fluorescencia medida con el espectrofluorómetro, el valor de  $r_{\min}$  es 0,055 y el valor de  $r_{\max}$  era una parámetro ajustable. Suponiendo una unión uno a uno, la concentración de sitios de unión libre  $[S]$  es:

$$[S] = [S]_0 - [F]_b \quad [2]$$

- 15 y se aplica la siguiente expresión:

$$r = r_{\min} + (r_{\max} - r_{\min}) K_b [S] / (1 + K [S]) \quad [3]$$

- La ecuación 3 se aplicó iterativamente para ajustar los datos  $r$  vs  $[S]$ , usando valores de partida diferentes de  $r_{\max}$  en las ecuaciones 1 y 2, con un programa basado en el algoritmo de Marquardt, de lo que se obtuvo el valor mejor fijado  $r_{\max} = 0,29$ . Las mediciones de control con sitios de unión de microtúbulos bloqueados por 10 $\mu$ M paclitaxel dieron valores  $r$  muy cercanos a  $r_{\min}$ , dentro de un intervalo  $[S]_0$  de 0 a 100 nM. Los microtúbulos entrecruzados (50-100nM de tubulina total) se valoraron después con concentraciones conocidas de Flutax-2. La unión se determinó como:

$$25 \quad [F]_b / [T]_0 = [F]_0 (r - r_{\min}) / [T]_0 (r_{\max} - r_{\min}) \quad [4]$$

donde  $[T]_0$  es la concentración de tubulina total, y  $r_{\max}$  y  $r_{\min}$  tienen los valores determinados previamente. La concentración de Flutax-2 libre es:

$$[F] = [F]_0 - [F]_b \quad [5]$$

La ecuación de unión para sitios independientes

$$30 \quad [F]_b / [T]_0 = n K_b [F] / (1 + K_b [F]) \quad [6]$$

se ajustó iterativamente a los datos con un programa basado en el algoritmo de Marquardt, con el fin de obtener los mejores valores fijados de  $n$ , el número de

sitios de unión de Flutax-2 por tubulina total, y  $K_b$ , y la constante de equilibrio de unión. Cuando se repitieron estos procedimientos usando el lector de placa de polarización, en vez del espectrofluorómetro, se obtuvieron unos valores  $r_{max}$  de 0,245 (con placas Costar 3599) y 0.27 (con placas negras Nunc 267342) y valores  $K_b$  y  $n$  dentro del error experimental.

#### 5. Mediciones de unión de ligando al sitio de unión a paclitaxel de microtúbulos por desplazamiento de Flutax-2.

Estas mediciones competitivas se realizaron con el lector de polarización en placa. Una solución de concentraciones conocidas de sitios de unión de microtúbulo y Flutax-2, ambas próximos a 50nM, en tampón GAB-GDP se preparó reciente a partir de las reservas concentradas de microtúbulos entrecruzados y Flutax-2. Se dispensó en alícuotas de 200  $\mu$ L (volumen final) a temperatura ambiente en placas con 96 cavidades (Costar cat. nº 3599, no se utilizaron las cavidades de los bordes). Las placas se seleccionaron comprobando que Flutax-2 permanecía en solución, en vez de adsorberse al poliestireno, midiendo los contenidos de las cavidades en el espectrofluorómetro (recuperación del 90%). Los ligandos a ensayar se añadieron en volúmenes pequeños de DMSO (concentración de DMSO final 2% v/v) para hacer las concentraciones duplicadas deseadas. También se comprobó que el paclitaxel no se adsorbía a la placa durante el ensayo, empleando  $^3$ H-Paclitaxel y un contador de centelleo. Las cavidades sin proteína y sin Flutax-2 se incluyeron para mediciones de calibrado y de fondo respectivamente (véase las medidas de anisotropía más arriba). Las placas se agitaron por rotación durante 10 minutos y se midieron 2 veces dentro de 30-90 minutos después de equilibrado a 25°C en el lector de microplaca. Los datos de anisotropía de Flutax-2 se calcularon con el software de evaluación (BMG) y se trazaron versus la concentración total de competidor.

Con el fin de medir la afinidad de unión de un ligando (L) que desplaza el ligando de referencia Flutax-2 de su sitio de unión de microtúbulo (S), se asumió estequiometría unitaria, determinándose la unión fraccionaria de Flutax-2 a partir de la anisotropía como

$$[F]_b / [S]_0 = [F]_0 (r - r_{min}) / [S]_0 (r_{max} - r_{min}) \quad [8]$$



y se aplicaron las siguientes expresiones:

$$K(F) = [SF] / [S][F] \quad [9]$$

$$K(B) = [SB] / [S][B] \quad [10]$$

$$[F] = [F]_0 - [SF] \quad [11]$$

$$5 \quad [L] = [L]_0 - [SL] \quad [12]$$

$$[S] = [S]_0 - [SL] - [SF] \quad [13]$$

Un programa de ordenador personal, que implementaba la solución a las ecuaciones (9-13) a partir de los valores conocidos de  $[F]_0, [L]_0, [S]_0$  y  $K(F)$ , se utilizó para encontrar el mejor valor de ajuste por mínimos cuadrados de la constante de unión de equilibrio del ligando competidor  $K(L)$  a los datos  $[F]_0/[S]_0$  versus  $[L]_0$  (Medrano, F.J., et al.; J.F. Díaz, programa sin publicar Equigra.4). La curva de desplazamiento ajustada se expresó como anisotropía y se trazó junto con los datos (ver Fig. 2).

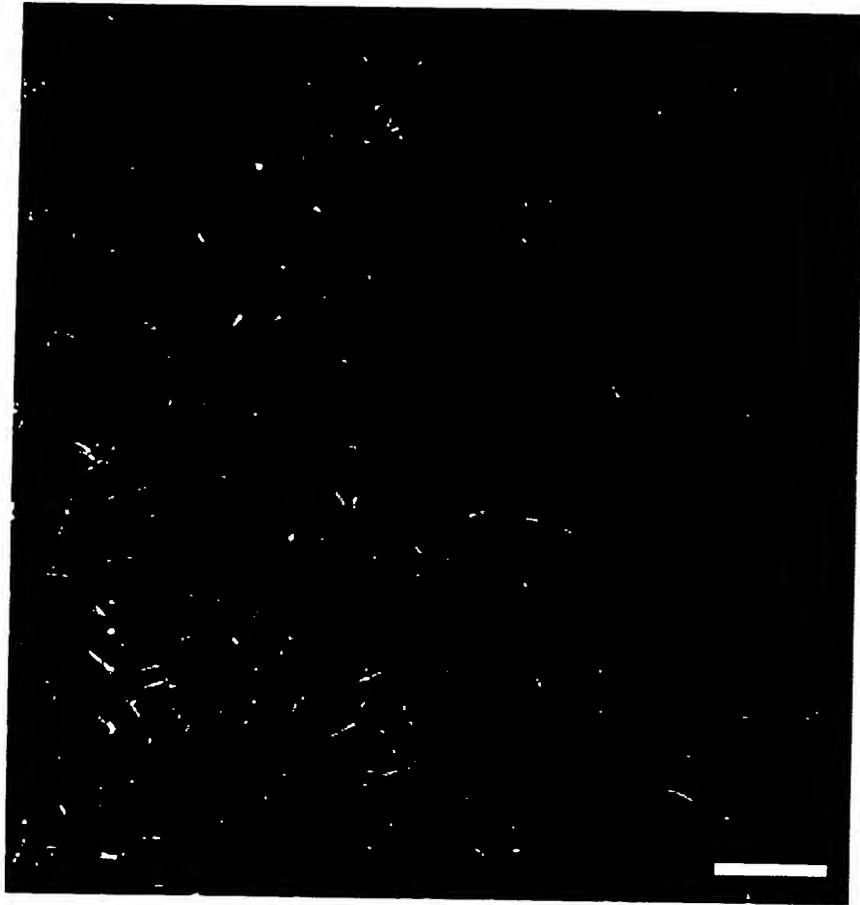
#### 15 **6. Desplazamiento de $^3H$ Paclitaxel de los microtúbulos por ligandos competidores.**

$^3H$  Paclitaxel 100nM, sitios de unión de microtúbulos 100nM y la concentración deseada de competidor en un volumen final de 200 $\mu$ L de tampón GAB-GDP que contenía 1 mg mL<sup>-1</sup> de albúmina de suero bovino (BSA) y DMSO al 1%, se incubaron durante 30 min. y se centrifugaron 10 min. a 50.000 rpm, 25°C, en tubos de policarbonato en un rotor TLA 100 con una ultracentrífuga TLX (Beckman, Palo Alto, CA). Los sobrenadantes y los tubos que contenían los sedimentos se separaron y se sometieron a recuento con un contador de centelleo líquido. Los datos pudieron tratarse numéricamente de modo similar a la sección de más arriba, sustituyendo Paclitaxel por Flutax-2.

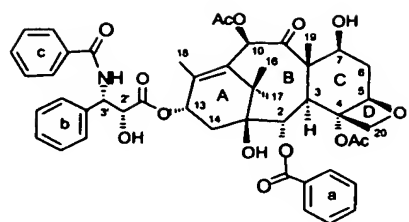
## REIVINDICACIONES

1. Método consistente en un ensayo homogéneo para la detección de cualesquiera sustancias antitumorales sustitutivas de paclitaxel en el sitio de unión de paclitaxel de los microtúbulos, caracterizado porque:
  - 5       - se basa en la combinación de una diana y una sonda,
  - se añaden las sustancias a ensayar a una solución de la diana que consiste en microtúbulos y la sonda fluorescente unida a la diana,
  - se determina el desplazamiento de las sustancias competidoras de la interacción de la sonda con la diana mediante la medida del descenso de anisotropía de la variación de intensidad de fluorescencia de la sonda o de la transferencia resonante de energía de la sonda a un aceptor adecuado.
  - 10       - y se identifica un compuesto biomimético de paclitaxel si se observa un descenso de la anisotropía de la fluorescencia de la sonda o mediante el descenso de transferencia resonante de energía de la sonda unida a un ligando.
- 15   2. Método según la reivindicación 1 caracterizado porque la diana de este método son microtúbulos ensamblados *in vitro* los cuales se estabilizan mediante entrecruzamiento químico y se conservan indefinidamente mediante diálisis contra un tampón de conservación y criopreservación.
- 20   3. Método según las reivindicaciones 1 a la 2 caracterizado porque la sonda de este método son cualesquiera derivados fluorescentes de paclitaxel que se unen específicamente a los microtúbulos, incluyendo entre otros:
  - 25       7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]Paclitaxel
  - 7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceinsulfonil)-L-alanil]Paclitaxel
  - 7-O-[N-(4'-tetrametilrodaminicarbonil)-L-alanil]Paclitaxel
  - 30       7-O-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-beta-alanil]Paclitaxel

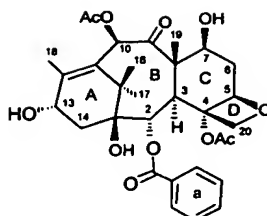
4. Método según las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque puede ser robotizado y porque las medidas se pueden realizar empleando lectores de fluorescencia en placa.
- 5 5. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 4 para la identificación de alto rendimiento (HTP) de compuestos antitumorales que actuen sobre el sitio de unión de paclitaxel en los microtubulos, provenientes de fuentes naturales o sintéticas.
- 10 6. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 5 para la evaluación de nuevos derivados de taxanos, epotilonas, discodermolida, eleuterobina, sarcodicitina y cualesquiera otros ligandos del sitio de unión de paclitaxel en los microtubulos.
7. Uso del método según las reivindicaciones 1 a la 6 para la evaluación del contenido en dichas sustancias activas de una fuente natural de producción.
- 15 8. Uso del método según la reivindicaciones 1 a la 7 para la evaluación de nuevas fuentes para la extracción o preparación de sustancias potencialmente activas a partir de precursores farmacológicamente no activos o semi-activos.
- 20 9. Uso del método según la reivindicaciones 1 a la 8 para el desarrollo de herramientas para la realización de ensayos en investigación oncológica y/o biológica relacionadas con los microtubulos celulares.



**Figura 1**



1 Taxol



2 baccatina III

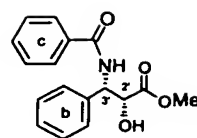
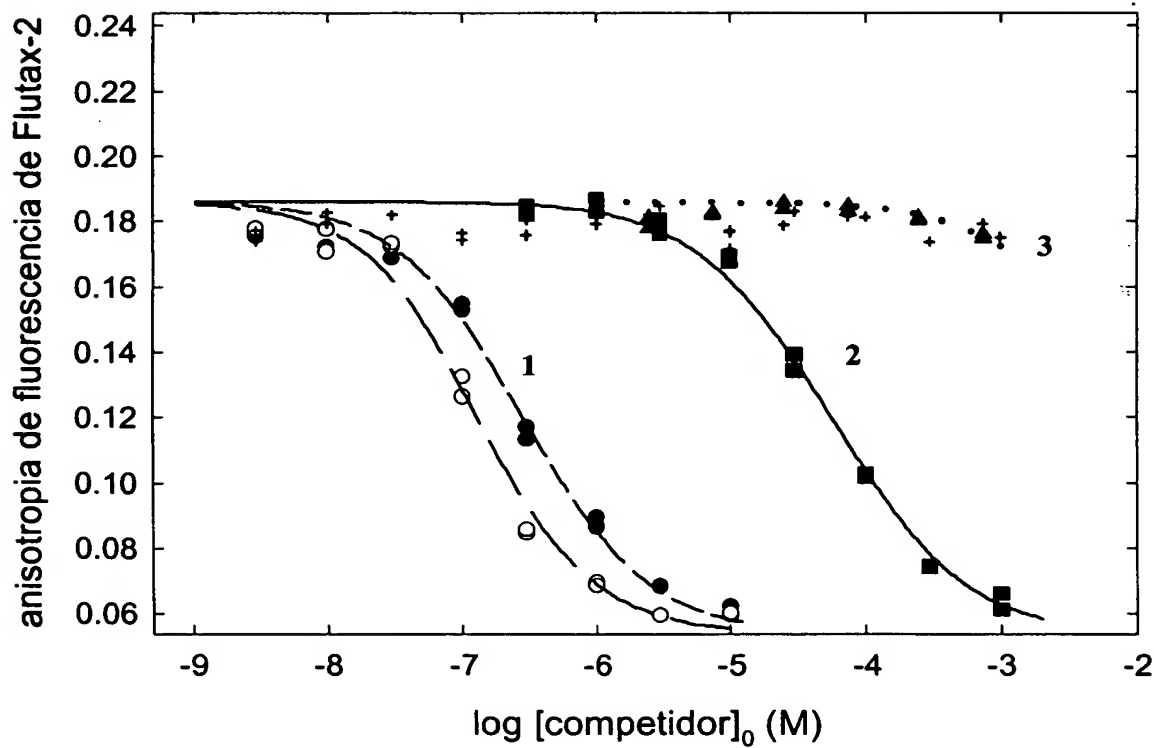
3 ester metílico de la  
cadena lateral en C-13

Figura 2

